



TITLE:

制癌剤感受性試験としての腎被膜下移植法(subrenal capsule assay)における各種免疫抑制剤投与の効果

AUTHOR(S):

三井, 博

CITATION:

三井, 博. 制癌剤感受性試験としての腎被膜下移植法(subrenal capsule assay)における各種免疫抑制剤投与の効果. 泌尿器科紀要 1990, 36(7): 749-755

ISSUE DATE:

1990-07

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/116956>

RIGHT:

制癌剤感受性試験としての腎被膜下移植法 (subrenal capsule assay) における各種免疫抑制剤投与の効果

山口大学泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

三 井 博

COMPARISON OF THE EFFECTS OF VARIOUS IMMUNOSUPPRESSIVE DRUGS ON SUBRENAL CAPSULE ASSAY (SRC ASSAY)

Hiroshi Mitsui

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine

We evaluated the effect of various immunosuppressive drugs in the SRC assay. We chose the most appropriate day to obtain the results of the SRC assay using the MBT-2 tumor. MBT-2 tumor-bearing mice of homogenic and heterogenic strains were separately given one of the three: cyclophosphamide, azathioprine or mizoribine. These drugs were evaluated on the 6th and the 11th day for the immunosuppressive effects expected from a host versus graft reaction.

Concerning the homogenic mice that were injected with drugs, on the 11th day, the growth of the tumor was favorably suppressed in comparison with the growth of the control group (A-1) due to the anti-tumor effect of immunosuppressive drugs. We concluded that the 6th day was the most, appropriate day to obtain the results of this assay.

Concerning the heterogenic mice, similar results were observed. In the mizoribine group, we subcutaneously injected 200 mg/kg on alternate days. Yet the implanted tumor grew almost at the same rate as that of the A-1 group. In this group, a histological study showed reduction of the tumor cells and few inflammatory cells.

We concluded that this drug was more useful than the others in the SRC assay and the suitable day for judgement was the 6th day.

(Acta Urol. Jpn. 36: 749-755, 1990)

Key words: Subrenal capsule assay, Chemosensitivity test, Immunosuppressive agent

緒 言

近年多くの制癌剤が開発され、臨床的に使用されるようになった。しかし制癌効果はまちまちでその効用を投与前に予測する必要に迫られる。副作用を少なくしてより効果的な癌化学療法を行うために、各種の制癌剤感受性試験が試みられてきている。in vitro の制癌剤感受性試験の一つとして colony forming assay 法がよく行われているが、この方法では検体の判定可能率が30~40%程度でしかなく、また判定まで約2週間の日程を要するという欠点がある¹⁾。一方、in vivo の方法の一つとしては、ヌードマウスを用いた皮下移植法がよく試みられてきたが腫瘍片の生着率が50%以下と悪く、かりに生着しても成長が遅く抗癌

剤の効果を判定するまでに日数がかかるという欠点がある。

Bogden らが始めた in vivo の制癌剤感受性試験である subrenal capsule assay 法 (以下 SRC assay 法と略す) は短期間に感受性の効果判定ができ、移植腫瘍の生着率が80%以上と良好で、腫瘍を一塊として扱うので間質を含めた抗腫瘍効果が評価でき、臨床応用への有用性が高いとされている^{2,4)}。しかし、免疫応答能のあるマウスを用いると、効果判定に際して移植片が宿主の免疫応答反応の影響を受けることが予想される。そこで、免疫抑制剤を用いて、SRC assay 法の効果判定の際問題となる宿主免疫応答を抑制した状態での制癌剤感受性試験の検討を加えた。すなわち、各種免疫抑制剤を投与して腎被膜下移

植腫瘍片への影響を比較し、適切な免疫抑制剤の種類と投与方法について検討を試みた。

材料および方法

移植腫瘍として FANFT 誘発マウス可移植膀胱腫瘍 (MBT-2, Dr. Soloway より供与) を用いた。MBT-2 腫瘍は C3H/He マウスの背側皮下にて当教室で継代されたものである。C3H/He マウスに対する腎被膜下への移植片を拒絶反応を有しない同系マウスのモデル (A group), CDF-1 マウスに対する腎被膜下への移植片を拒絶反応を有する異系マウスのモデル (B group) として用いた。マウスは体重 20~25 g, 5週齢の雌を各グループ6匹として実験に用いた。宿主免疫反応を抑制するための免疫抑制剤は cyclophosphamide (CPM), azathioprine (AZT), mizoribine (MZR) の3種類を用いた。各グループの薬剤投与量は Table 1 に示す通りで, BDF-1 マウスに対する1回投与時の LD 10 量を参考にして体液性および細胞性免疫応答を十分に抑制する投与量を選んだ²⁾。

SRC assay 法は Bogden らの方法³⁾ に準じて行った。すなわち, C3H/He マウスの皮下に継代してある MBT-2 腫瘍を清潔に切り取り, High GEM 培養液内にて腫瘍を約 1 mm 大の大きさに細切する。各群のマウスは Avertin 麻酔 (2% tribromoethanol+tertiary amyl alcohol, 98% ethanol) を 0.1 ml/10 g 行ったあと, 左腰部の斜切開で左腎臓を体外に出血しないように取り出した。腎被膜下に細切した腫瘍片を 22-G の lumbar 針を用いて直視下に植え込んだあと10倍の実体顕微鏡下に観察し腫瘍の長径 (a) と短径 (b) を計測し, その平均値 ($\Delta L = a + b/2$) を求め, 治療前の大きさとした。各免疫抑制剤

は使用直前に無菌蒸留水で1回投与量が 0.1 ml になるように調整して溶解し, 10 日間の実験期間中 4°C で保存した。各グループのマウスは腫瘍片を移植後 4 日目, 6 日目, 11日目に屠殺し, 腎臓を取り出し, 腫瘍径を同様に計測して長径 (a') と短径 (b') の平均値 ($\Delta L' = a' + b'/2$) を求め治療後の大きさとした。

以上のようにして求めた移植時と腎摘除術の腫瘍片の大きさの変化 ($\Delta L' - \Delta L$) より宿主免疫応答の程度を比較した。なお, マウスに体重減少や毛羽立ちなどの所見が認められる場合は急性毒性の出現のよるものとして投与を中止して, 判定より除外した。

腎被膜下移植片における腫瘍細胞と浸潤円形細胞の程度を組織学的に観察するために, HE 染色を行い, 光学顕微鏡 (×100 倍) にて移植片の中心部を観察した。移植腫瘍片における腫瘍細胞の占める割合を少ない方より便宜上つぎのように I-IV の4段階に grade 分類を行った。grade I (10%以下), grade II (10~50%), grade III (50~90%), grade IV (90%以上)。

結 果

A) 経時的变化

1) 免疫抑制剤非投与群 (コントロール群) 同系マウス: group 1 (A-1) の腫瘍径の変化は移植当日に較べて4日目で0.9±0.8倍, 6日目で1.8±0.4倍, 11日目で4.9±0.9倍と順調な成長を見せた。

異系マウス: group 1 (B-1) の腫瘍径の変化は4日目で1.5±0.3倍, 6日目で2.3±0.2倍, 11日目で1.6±0.9倍となり, 同系マウスに比べて6日目以降では円形細胞の浸潤が著明となってきて, 腫瘍の成長が抑制される傾向にあった。11日目で有意差はさらに著明となった。

Table 1. Injection schedule of immunosuppressive drugs

Group	Drug	dose(mg/kg)	Injection day
Group1(A-1,B-1)	(-)		
Group2(A-2,B-2)	CPM	200	- 1
Group3(A-3,B-3)	AZT	200	0, 2, 4, (6, 8, 10)
Group4(A-4,B-4)	MZR	200	0, 2, 4, (6, 8, 10)
Group5(A-5,B-5)	CPM	100	- 1
	+ AZT	100	0, 2, 4, (6, 8, 10)

A: C3H/Heマウス(同系)

B: CDF1マウス (異系)

2) 免疫抑制剤投与群

同系マウスでは group 2 (A-2) の CPM 投与群では移植時に比べて6日目で 3.0 ± 0.7 倍, 11日目で 5.3 ± 1.2 倍となり11日目まで A-1 と変わらない移植腫瘍の成長を示した. group 3 (A-3) の AZT 投与群では6日目で 2.7 ± 0.5 倍, 11日目で 2.8 ± 0.9 倍, group 4 (A-4) の MZR 投与群では6日目で 3.6 ± 0.8 倍, 11日目で 3.4 ± 0.9 倍, group 5 (A-5) の CPM+AZT 投与群では6日目は 3.7 ± 0.3 倍, 11日目で 3.7 ± 0.7 倍であった. すなわち, A-3, A-4, A-5 では6日目までは腫瘍の成長はよいが, 11日目では成長は A-1 と比較して有意に抑制されて AZT, MZR の投与による腫瘍成長抑制効果が考えられた (Fig. 1-A).

異系マウスでは group 2 (B-2) は4日目で 1.6 ± 0.6 倍, 6日目で 3.4 ± 0.5 倍, 11日目で 2.2 ± 0.4 倍, group 3 (B-3) は4日目で 1.6 ± 0.1 倍, 6日目で 2.4 ± 0.4 倍, 11日目で 2.0 ± 0.4 倍, group 4 (B-4) は4日目で 1.6 ± 0.5 倍, 6日目で 3.0 ± 0.5 倍, 11日目で 3.0 ± 0.4 倍, group 5 (B-5) は4日目で 1.8 ± 0.5 倍, 6日目で 2.2 ± 0.5 倍, 11日目で 2.9 ± 0.6 倍であった (Fig. 1-B).

すなわち, 6日目までは B-2, B-4 は同系マウスのコントロール群 (A-1) の成長と同程度の成長がみられ, B-3, B-5 では成長は抑制されていた. 11日目では

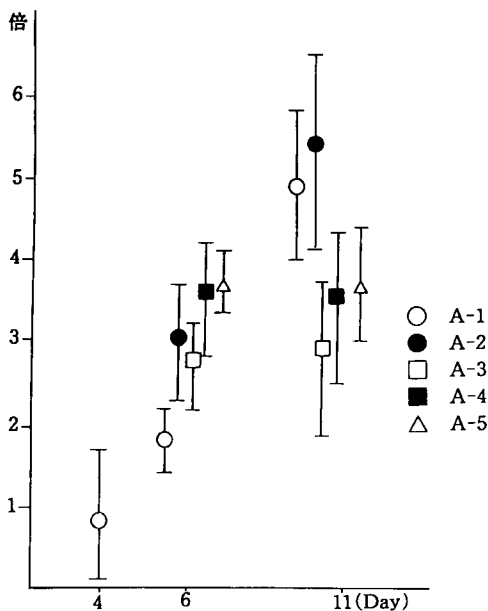


Fig. 1-A. Growth of tumor in C3H/He mice (group A)

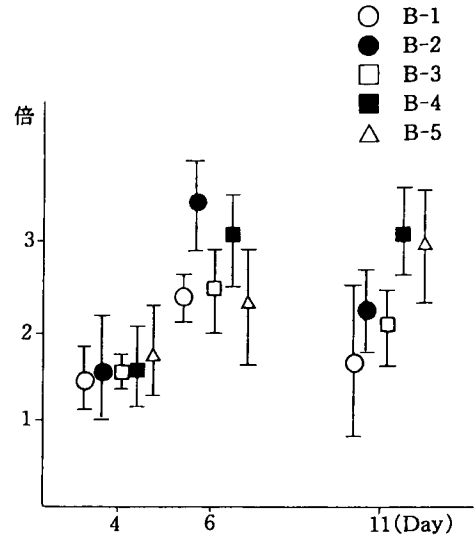


Fig. 1-B. Growth of tumor in CDF1 mice (group B)

はいずれの B グループの成長も A-1 に比べて著明に抑制されていた.

B) 各薬剤間での比較 (6日目および11日目判定)

同系マウスの免疫抑制剤投与群に関しては6日目判定では A-1 の 23.0 ± 4.1 に比べて A-2 は 27.1 ± 5.9 , A-3 は 21.4 ± 4.2 , A-4 は 28.9 ± 6.5 , A-5 は 30.7 ± 3.6 といずれも有意な差を認めなかった. しかし, 11日目判定では A-1 の 46.7 ± 18.1 に比べて A-2 は 49.9 ± 10.5 と有意差を認めないが, A-3 は 23.3 ± 10.3 , A-4 は 31.3 ± 9.2 , A-5 は 33.7 ± 2.5 となり A-1 に比べて腫瘍片の成長は有意に抑制されていた ($p < 0.05$).

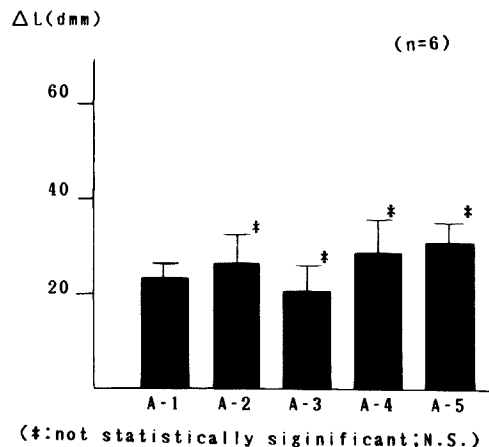


Fig. 2-A. Growth of tumor on the 6 day in group A

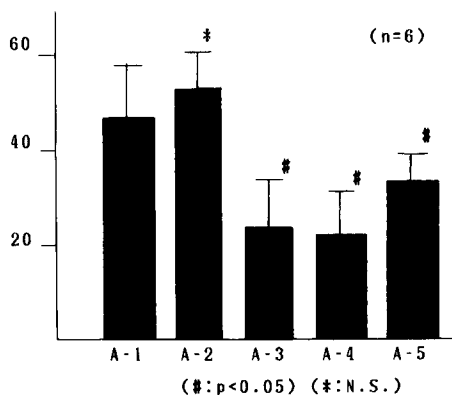
$\Delta L(\text{dmm})$ 

Fig. 2-B.

Fig. 2-B. Growth of tumor on the 11 day in group A

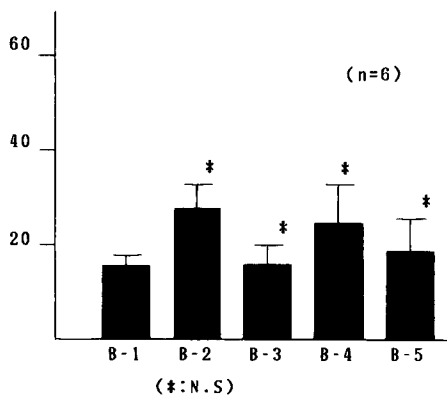
 $\Delta L(\text{dmm})$ 

Fig. 3-A. Growth of tumor on the 6 day in group B

(Fig. 2-A, 2-B.)

異系マウスの免疫抑制剤投与群に関しては6日目判定では B-2 は 28.2 ± 2.5 , B-4 は 25.1 ± 7.0 と A-1 の 23.0 ± 4.1 と比較して有意な差がなく腫瘍片は成長しているが, B-3 は 15.6 ± 3.9 , B-5 は 19.4 ± 6.1 と腫瘍片の成長は抑制され, 11日目判定ではいずれのB群も腫瘍片の成長は A-1 に比べて有意に抑制されていた ($p < 0.05$). (Fig. 3-A., 3-B.)

3) 組織学的検討

同系マウスでは各グループとも6日目判定, 11日目判定のいずれも腫瘍細胞の占める割合は grade IV で, 移植腫瘍片への円形細胞浸潤はほとんど見られな

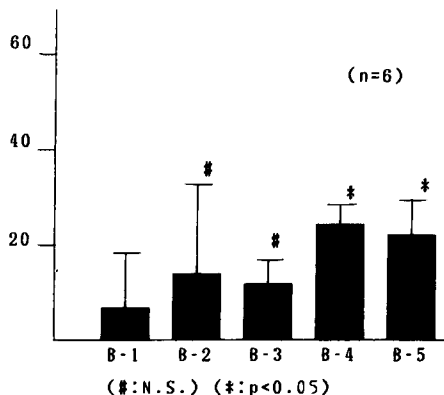
 $\Delta L(\text{dmm})$ 

Fig. 3-B. Growth of tumor on the 11 day in group B

かった。

異系マウスでは, B-1 は4日目で細胞浸潤が強く, 6日目ではほとんどリンパ球や fibrosis におきかわっており, 宿主免疫反応に対して免疫抑制剤投与の必要性があることがわかる. B-2 は6日目までの変化は grade IV であったが11日目では grade I となり腫瘍細胞はほとんど認められなかった. B-3 では6日目までの変化は grade IV を保っているが11日目では円形細胞の浸潤が強くなり grade III となった. B-4 および B-5 はともに11日目まで腫瘍細胞の割合は grade IV を保っており, 円形細胞浸潤も少なかった (Fig. 4.).

すなわち, 異系マウスの組織像では6日目までは各免疫抑制剤投与群とも腫瘍細胞の構築はよく保たれていたが, 11日目判定になると B-2, B-3 の CPM, AZT 投与群では円形細胞の浸潤が強く, 免疫抑制効果は不十分であると思われた. 腫瘍径と組織像を合わせて考えると, 同系マウスモデルにおいては移植腫瘍の成長は11日目までは充分保たれているが, 免疫抑制剤による腫瘍の成長抑制効果が加味される. 異系マウスにおける6日目判定では B-3, B-4 の AZT, MZR 投与群は同系マウスの対照群と比較して有意差のない腫瘍径の成長と腫瘍細胞の構築を認めたが, B-2, B-5 の CPM, CPM+AZT 投与群では腫瘍の成長は抑制されていた. 異系マウスにおける11日目判定では CPM 投与群 (B-2) では円形細胞浸潤が著明で, AZT, MZR, CPM+AZT 投与群 (B-3, B-4, B-5) では腫瘍の構築をよく保っているが, 腫瘍の成長は強く抑制されているので, 免疫抑制剤の総投与量の増加

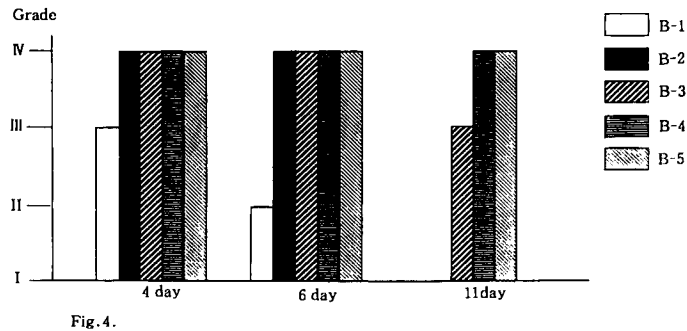


Fig. 4. The rate of tumor cells in the implanted graft in group B

に伴う影響が示唆された。したがって、11日目まで宿主免疫応答を抑制しようとする、免疫抑制剤による抗腫瘍効果が多分に加味される可能性があり、判定日としては不適当であると考えられる。投与量の調整も必要であるが腫瘍径および形で本 assay 方を判定するためには MZR を用いた6日目判定が最も有用であると考えられた。

考 察

Bogden らによって紹介された SRC assay 法^{3,4)}は *in vivo* の制癌剤感受性試験のひとつとして開発された。本法はマウスを用いるため測定方法、判定日、免疫抑制剤の種類および投与方法、抗癌剤の投与方法および量など検討すべき問題点も多い。測定方法は、坂井ら⁵⁾は三方向測定がより判定に有用性が高いと報告しているが、免疫応答による誤差を考慮すると、二方向測定でも十分に評価できると思われる。判定日は4日目、6日目、10日目判定等^{6,7)} いろいろな判定日が検討されているが、免疫抑制剤を併用して判定日ができるだけ延長した方が抗癌剤の効果をみるうえで有益と思われる。

本法は最初、ヌードマウスを用いて11日目に判定を行っていた。その後免疫応答能のあるマウスを用いて本 assay 法が検討され、6日目判定でもヌードマウスを用いたときと有意差のない結果を得たと報告されている⁸⁾。しかし、host の免疫応答は *homograft* に対して抗原認識、感作リンパ球の産生、循環中への出現と進んで数日間の潜伏期を要するといわれる。したがって、移植数日間は移植片側と宿主側との毛細血管の吻合により生着の方向へ進む。その後、移植片の周囲に小リンパ球の浸潤が現れ、6～8日の間に毛細血管内の血栓形成に基づく血流の遮断がみられ、10～13日の間に移植片は拒絶される。*xenograft* と *homograft* の違いは質的なものというよりも免疫応答時の

抗原の量的な差と考えられる^{9,10)}。臨床例を本 assay 法で検定すると、人癌細胞とマウスという異種間ではより強い免疫応答が起こることが予想される。そのため適切な免疫抑制剤を用いなければ、腫瘍径の変化は計測しても、腫瘍本体の成長とは別のものを計測する可能性があり、本 assay 法の信頼性を低下させることとなる。組織学的な検討を加えれば確実性は高まるが、迅速な感受性試験という利点からは外れることになる。したがって、免疫応答能のあるマウスを用いて、移植腫瘍に対する免疫応答を抑制し、臨床検体に対して本 assay 法を行うためには、至適な免疫抑制剤の投与と判定日を決定することは最大の課題であると考えられる^{11,12)}。各免疫抑制剤の選択は当教室ですでにラットの腎移植モデルで使われている CPM, AZT, MZR を用いた。作用機序の異なる各種免疫抑制剤を投与して比較すると6日目までは移植腫瘍片の大きさは無処置群と変わらないが、11日目になると無処置群に比べて抑制される。抑制の程度は CPM 投与群ではほとんど認めないが、AZT 投与群、MZR 投与群では有意に多かった。これは CPM は前日投与のみであるため11日目では影響がなくなっているが、AZT, MZR は総投与量が6日目までは 600 mg/kg となり11日目では6日目までに比べて2倍量を投与することになる。したがって、代謝拮抗剤である AZT, MZR が移植腫瘍に対して抗腫瘍作用をおよぼしたものと考えられる。

異系マウスにおける無処置群では同系マウスの無処置群に比べて移植腫瘍の成長の抑制が4日目ですでに始まっており、11日目には有意に成長は抑えられている。組織学的にも6日目には円形細胞の浸潤は著明で腫瘍細胞は減少しており、11日目にはさらに著明となり腫瘍細胞はほとんど認めない。異系マウスにおける AZT, MZR 投与群は6日目判定では同系マウスの無処置群と比べ同程度の成長を示すが、11日目判定では

無処置群より有意に成長は抑制される。すなわち、AZT, MZR の投与によって異系マウスの免疫応答は6日目までに抑制されるが、11日目判定では抗腫瘍効果も加味されている可能性が示唆される。CPM 投与群は移植前日に1回の投与をするだけであるから、同系マウスでは、6、11日目の腫瘍の成長は無処置群のそれと有意な差はない。異系マウスについてみると、6日目までは他の薬剤投与群と同様の大きさであるが、11日目判定では無処置群と同じく著明に腫瘍の成長は抑制されている。また組織学的にもリンパ球の浸潤が著明であることを考え合わせると、CPM の影響は6日目までであり、11日目にはその影響力はなくなり無処置群と変わらなくなると考えられる。アルキル化剤である CPM の作用機序は細胞の DNA, RNA 代謝の障害で、活性化されたリンパ球の分裂・増殖期に作用して自己抗体の産生を抑制する。代謝拮抗剤である AZT は肝で 6-MP に代謝され、イノシン酸が adenosine monophosphate に変換するのを抑制し、細胞分裂毒として免疫担当細胞の分裂を抑制する。MZR は核酸合成阻害であるが、CPM や AZT とは作用部位がやや異なり、また細胞内 cyclic AMP の低下を招き、免疫担当細胞の T 細胞や B 細胞を抑制する。これらの各種免疫抑制剤を用いて SRC assay 法での有用性を検討したが、本 assay 法に有用と思われる判定日は6日目が良いと考えられる。MBT-2 腫瘍を用いた本実験に関して、異系マウスモデルに対する11日目の結果から MZR が腫瘍への影響が一番少ないように思われ、本薬剤が最も効果的ではないかと考えられる。

結 語

SRC assay 法における免疫抑制剤添加の有用性について検討するために、MBT-2 腫瘍を用い、同系および異系マウスモデルを作成して cyclophosphamide (CPM), azathioprine (AZT), mizoribine (MZR) を投与して宿主免疫応答に対する抑制効果と判定日について評価し、以下の結果を得た。

1) 同系マウスモデルは11日目まで順調な成長を認めるが、異系マウスモデルでは6日目で著明な細胞浸潤を認めることより、免疫抑制剤の適切な投与を必要とする。

2) 同系マウスモデルの実験では、AZT, MZR 投与群は11日目になると薬剤による腫瘍の成長抑制作用が出現するため、6日目判定がより適切である。

3) 異系マウスモデルについても、11日目判定では同様の成長抑制作用が認められる。6日目判定では腫

瘍の成長は $A-1 \geq CPM \geq MZR > CPM + AZT > AZT$ 投与群の rank order で、CPM, MZR 投与群の腫瘍の成長が同系マウスのコントロール群と同程度である。

4) 6日目判定における組織像の検討において、CPM 投与群はすでに円形細胞浸潤が認められるが、MZR 投与群は腫瘍細胞の構築はよく保たれている。従って、同系マウスモデルに近い形で SRC assay 法を行うには、MZR 200 mg/kg 投与による6日目判定が最も有用であると考えられた。

稿を終えるにあたり、終始指導ならびに御校閲を賜りました恩師酒徳治三郎教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究に際し直接御指導をいただきました山本憲男助教授に感謝すると共に厚くお礼を申し上げます。

本論文の要旨は第75回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen BJ, Durie BGM, Alberts DS and Moon TC: Quantitation of differential sensitivities of human tumor stem cells to anticancer drugs. *New Engl J Med* 298: 1321-1326, 1978
- 2) 吉沢 宗敏, 辻野 正俊, 水野 公雄, 早野 和夫: Mizoribin (Bredinin) の免疫抑制作用に関する基礎的研究 II. 体液性および細胞性免疫応答に対する抑制作用. *臨床免疫* 14: 228-237, 1982
- 3) Bogden AE, Kelton DE, Cobb WR and Esber HJ: A Rapid Screening Method for Testing Chemotherapeutic Agents against Human Tumor Xenografts. In: *Proceedings of Symposium on the Use of Athymic Mice in Cancer Research*. pp. 231-250, Fischer, New York, 1978
- 4) Bogden AE, Cobb WR, LePage DJ, Haskell PM, Gulkin TA, Ward A, Kelton DE and Esber HJ: Chemotherapy responsiveness of human tumors as first transplant generation in the normal mouse. *Cancer* 48: 10-20, 1981
- 5) 坂井保信, 佐々木常雄, 岩本昌平, 小池盛雄: 新しい抗癌剤感受性試験 Subrenal Capsule Assay. *癌と化療* 13: 1249-1257, 1986
- 6) Levi FA, Blum JP and Lemaigri G: A four-day subrenal capsule assay for testing the effectiveness of anticancer drugs against human tumors. *Cancer Res* 44: 2660-2667, 1984
- 7) Fingert HJ, Treiman A and Pardee AB: Transplantation of human or rodent tumors into cyclosporine-treated mice: a feasible model for studies of tumor biology and

- chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7927-7931, 1984
- 8) Bogen AE, Haskell PM, LePage DJ, Kelton DE, Cobb WR and Esber HJ: Growth of human xenografts implanted under the renal capsule of normal immunocompetent mice. *Expl Cell Biol* **74**: 281-293, 1979
- 9) 武谷健二, 野本亀久雄, 森 良一: 移植免疫. 免疫生物学 pp. 173-184, 朝倉書院, 東京, 1978
- 10) Milgrom F: 移植免疫. 免疫学, 基礎と応用. 八木康夫, 中村 弘監訳. pp. 451-462, 広川書院, 東京, 1978
- 11) 藤田昌英, 藤田史子, 下妻晃二郎, 阪本康夫, 楠山剛紹, 薄金真男, 折笠 久, 田口鐵男: 制癌剤感受性試験へのヌードマウス. 人癌系および腎被膜下移植法の応用. *癌と化療* **13**: 1227-1233, 1986
- 12) 根本良介, 内田克紀, 鳥居 徹, 石川 悟, 小磯謙吉: マウスの腎被膜下移植法による制がん剤感受性試験. *癌と化療* **13**: 1238-1240, 1986
- (Received on December 18, 1989)
(Accepted on February 28, 1990)